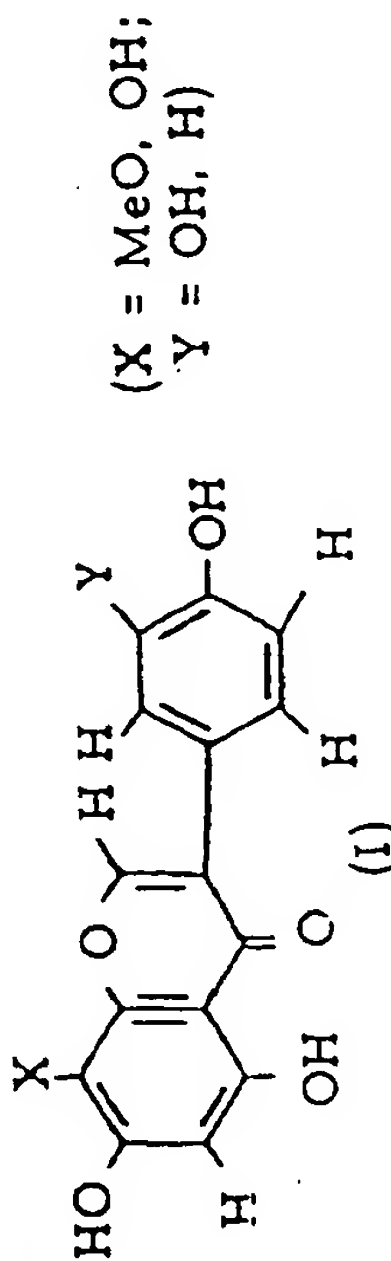


DERWENT PUBLICATIONS LTD.

27437

27437A/15 MICROBIOCHEMICAL RE 19.06.74 JA-069119 (25.12.75) A23k A61k C12d Physiologically active iso-flavone prodn. - by aerobically culturing Aspergillus on potato starch, glucose, soybean medium	MICR- 19.06.74 *J5 0160-483	R(6-A1) D(5-C), I
Isoflavones (I)  (X = MeO, OH; Y = OH, H)	are produced by an aerobic culture of fungi; 3',4',5,7-tetrahydroxy-8-methoxyisoflavone (II), psi-tectorigenin (III, X = OMe, Y = H), and 8-hydroxygenistein (IV, X = OH, Y = H) are produced by Aspergillus.	1, soybean meal, 2, KH_2PO_4 0.1, and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%; the pH changed to 5.6, 3.6, 3.2, 5.0 and 6.2 after 1, 2, 3, 4, and 5 days of the cultivation. The culture filtrate (9 l.) was extd 3 times with 4.5 l. BuOAc at pH 2.0. The cells (1.2 kg) are also extd. with 5 l. MeOH and concd. to dryness. The active substances were extd. with 1 l. water (pH 8.0) and then with 0.5 l. BuOAc 3 times at pH 2.0 and combined with the above extract of the culture filtrate. The combined extract was concd. to dryness yielding 12.3 g tar substance. It was subjected to silica gel chromatography eluting with CHCl_3 -Me MeOH (50:1) to separate (III), genistein (V), (II), orobole (VI) and (IV). Each fraction was dried, subjected to "Sephadex LH-20" (RTM) silica gel chromatography and crystd. from MeOH- C_6H_6 . Yields were 15.8, 4.8, 80.3, 0.1, and 4 mg for (II), (III), (V), (VI) and (IV). They were sol. in alkaline water, MeOH, EtOH, BuOH, Me_2CO , DMSO and hardly sol. in C_6H_6 , CHCl_3 and toluene. ID_{50} against β -3,4-dihydroxy-phenyl-L-alanine decarboxylase were 0.2, 51.0, and 2.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for (II), (III) and (IV). (14pp-).
USE L-Dopa decarboxylase inhibitor. EXAMPLE A. niger NRRL 3122 was cultured with shaking at 27°C for 5 days on a medium (pH 6.0) contg. potato starch 2 glucose	27437A	J50160483



第 2 号 発行なし

(2000) 特 許 願

(特許法第38条に於ける)
(の発明による特許出願)

昭和49年6月19日

特許庁長官 官 署

1. 発明の名称 生理活性を有するイソフラボ
ン化合物の微生物による製造法

2. 特許請求の範囲に記載された発明の数・・・4

3. 発 明 者

注 冊 東京都港区豊玉北4丁目2番地

氏 名 梅 沢 英 夫 外2名

4. 特許出願人

住 所 東京都品川区上大崎3丁目1番地23号

名 称 財団法人微生物化学研究会

代表者 市 川 英 二

一 国 籍

5. 代 理 人

住 所 〒105 東京都港区西新橋1丁目2番9号

三井物産館内 電話(591)0261番

(2000) 氏 名

金 丸 教 男

19 969119

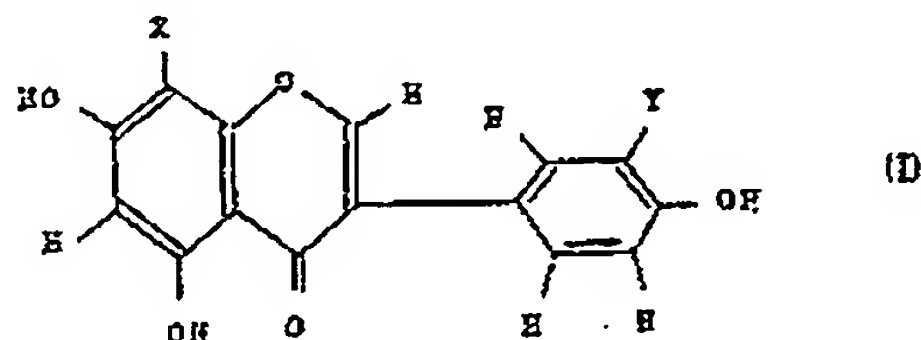
明 細 書

1. 発明の名称

生理活性を有するイソフラボン化合物の
微生物による製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 系状図に示す次の一般式



(式中、Xはメトキシ基でYはヒドロキシ基である
るか又はXはメトキシ基でYは水素原子であるか
又はXはヒドロキシ基でYは水素原子である)の
イソフラボン化合物の生産菌を好氣的に培養して
該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採
取することを特徴とする、微生物による上記一般
式(I)のイソフラボン化合物の製造法。

1

① 日本国特許庁

公開特許公報

①特開昭 50-160483

④公開日 昭50.(1975) 12. 25

②特願昭 49-69119

②出願日 昭49.(1974) 6 . 19

審査請求 未請求

(全14頁)

庁内整理番号

7110 49

6617 44

7169 44

②日本分類

36(2)D521

30 A32

16 E41

⑤Int. Cl²

C12D 13/00

A61K 37/64

A61K 31/35

A23K 1/16

(2) アスペルギルス属に属する3',4',5,7-テトラ
ラハイドロキシ-8-メトキシイソフラボン生産
菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培
養物から該化合物を採取することから成る、3',4',
5,7-テトラハイドロキシ-8-メトキシイソフ
ラボンの製造法。

(3) アスペルギルス属に属するフサイ・テクト
リゲニン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生
産せしめ、培養物から該化合物を採取することか
ら成る、フサイ・テクトリゲニンの製造法。

(4) アスペルギルス属に属する8-ハイドロキ
シグニスチン生産菌を好氣的に培養して該化合
物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取する
ことから成る、8-ハイドロキシグニスチンの
製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は微生物を用いる醸酵法によりドーパ脱
炭酸酵素に対して阻害作用をもつ新規物質3',4',5,
7-テトラハイドロキシ-8-メトキシイソフラ
ボン、あるいは公知物質4',5,7-トリハイドロキ

2

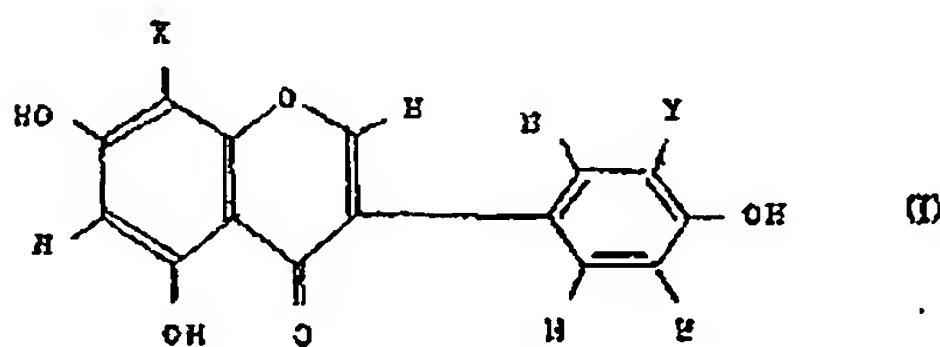
シ-8-メトキシイソフラボン(すなわちプサイ・テクトリゲニン(psi-tectorigenin))又は3,4,5,7-テトラヒドロキシイソフラボン(すなわち8-ヒドロキシグニステイン(8-hydroxygnistein))を製造する方法に關する。

本発明者等は人の高血圧及びパー・キンソン氏病のドーパでの治療における阻害薬の開発を目的として、微生物の培養液中にアモテイクナムノ酸類のカルボキシル基を炭素鎖するドーパ脱炭酸酵素(以下D.D.Oと略記する)の作用を阻害する物質を系統的に探索し、最終的に培養液及び菌体中にD.D.O阻害物質が各種存在することをみだし、これらを抽出分離し化合物を究めイソフラボン骨格を持つ3種の化合物である事を見出した。さらに化学的な詳細な研究から、これら化合物の一つは新規化合物である3,4,5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボンであることを明らかにするとともに他の二つの化合物が3,5,7-トリヒドロキシ-8-メトキシイソフラボン及び4,5,7,8-テトラヒドロキシイソフラボン

3

ン基でY=水素原子である場合の化合物が8-ヒドロキシグニステイン(以下では化合物(II)ともいう)である。

それ故、本発明の要旨とするところは、最終的に得る次の一般式、

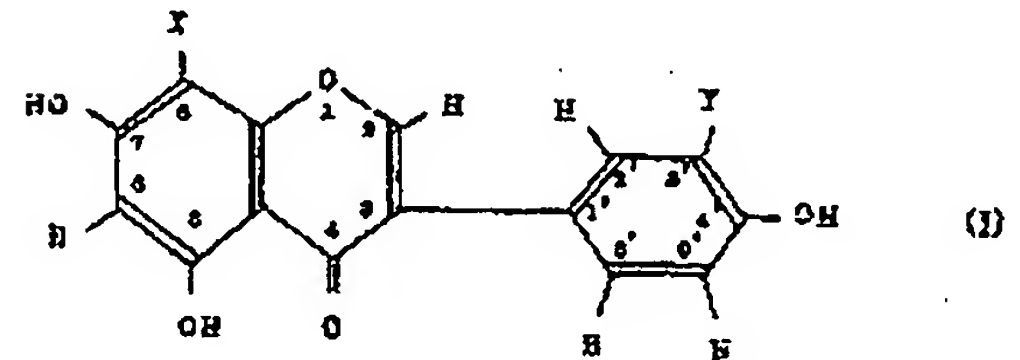


(式中、Xはメトキシ基でYはヒドロキシ基であるか又はXはメトキシ基でYは水素原子であるか又はXはヒドロキシ基でYは水素原子である)のイソフラボン化合物の生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することを特徴とする、微生物による上記一般式(I)のイソフラボン化合物の製造法にある。

本発明以前においては、前記化合物(I)は天然物

ンであることを周知した。またこれら3種の化合物を微生物の培養物から採取する方法を説明した。

上記の3つのイソフラボン化合物は次の一般式



(式中、Xはメトキシ基でYはヒドロキシ基であるか又はXはメトキシ基でYは水素原子であるか又はXはヒドロキシ基でYは水素原子である)で表わされるが、一般式(I)においてX=メトキシ基及びY=ヒドロキシ基である場合の化合物が新規化合物3,4,5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボン(以下では化合物(II)ともいう)であり、X=メトキシ基及びY=水素原子である場合の化合物がプサイ・テクトリゲニン(以下では化合物(III)ともいう)であり、さらにX=ヒドロキ

4

としても化学合成物としても報告されておらず本発明者らが初めて発見した新規物質である。また化合物(III)は、テクトリゲニンの構造異性体として、ウィルソン・ベイカー等(Wilson Baker et al)により1953年初めて合成されChemistry and Industry March 277, 1953, に報告されており、化合物(II)については1960年ブタペスト工科大学のエル・フアルカスとジェー・バラディ(L. Farkas and J. Varnady)により合成されActa chimica Academiae Scientiarum Hungaricae 24, 225-230, 1960に報告されているが、いずれの化合物も微生物の培養物より採取したのは本発明者らが最初である。さらに本発明者らはこれら化合物(I), (II), (III)の各種酵素活性に対する阻害作用の研究から、D.D.O阻害活性を有することの他、これら化合物がヒステジン脱炭酸酵素(以下H.D.Oと略記する)阻害活性、カタール・オームアル転位酵素(以下COMTと略記する)阻害活性及びエストロゲン活性を有することを見出した。これら阻害組合せは本発明者らにより

初めて明らかにされ、これ以前には知られていなかった。以上の抗真菌性を有する化合物(I)、(II)、(III)は、D.D.C及びO.O.M?活性を阻害することから、ペニンシリン系のドーパで治療に於ける補助薬として、ノルアドレナリンの生合成を阻害することにより高血圧症の治療薬、H₂O活性を阻害することから、抗アレルギー、抗炎症、の治療薬として、またエストロゲン活性を有する事から避妊及び動物での体質増進、生育促進剤としての用途が考えられる。

本発明の方法で用いる糸状菌に属する一般式(II)の化合物の生産菌の一例としてはアスペルギルス・ニガー NRRL 3122 (Aspergillus niger NRRL 3122) があり、このアスペルギルス・ニガー NRRL 3122 株は、米国農務省農業研究局北部利用研究開発部(NRRL)に保存された公知の保存菌であつて本発明者らがNRRLより分譲を受けたものである。なお、このアスペルギルス・ニガー NRRL-3122 株は工業技術院微生物工業技術研究所に保工研保第2003号として寄託

アスペルギルス属に属するβ-ヒドロキシグニスチン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、β-ヒドロキシグニスチンの製造法が提供される。

本発明の方法を実施するに当つては、使用生産菌を微生物の通常公知の培養法で好氣的に培養して培養物中に目的化合物を生産せしめることができる。また本発明の目的化合物(II)、(III)、(IV)を生産せしめるためにカビ、放線菌その他の微生物の培養に用いられる栄養源はすべて利用できる。例えば炭源としてはグルコース、マルトース、デキストリン、糊粉、ラクトース、サツカロース、グリセリンなど、又窒素源としてはペプトン、肉エキス、酵母、酵母エキス、大豆粉、綿実粉、落花生粉、コーンステープリカー、米ぬか、無機窒素化合物などを利用できるが、特に化合物(II)、(III)、(IV)の生産のためには、グルコース、糊粉を炭源とし、大豆粉を窒素源とした培養地が、これら化合物の生産のため好ましい培養地である。化合物(II)、

されてある(昭和46年4月25日特許庁に申請)。

微生物は人工的に、又自然界においても発酵を起しやすいが本発明にいうアスペルギルス・ニガー NRRL 3122 はその発酵菌の全てを包括する。本発明に言う該菌はイソフラボン化合物(II)、(III)、(IV)を生産し、これらの菌及び発酵菌と明確に区別されないものはすべてこれを含む。

それ故、本発明の第一の実施態様によれば、アスペルギルス属に属するβ,β',β'',γ-テトラヒドロキシ-β-メトキシイソフラボン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、β,β',β'',γ-テトラヒドロキシ-β-メトキシイソフラボンの製造法が提供される。

また、本発明の第二の実施態様によれば、アスペルギルス属に属するブサイ・テクトリゲニン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、ブサイ・テクトリゲニンの製造法が提供される。

さらに、本発明の第三の実施態様によれば、ア

8

(II)、(III)を生産せしめるため必要とするならば、紙、板紙、金網紙、重金網紙の廢棄を加えることもできる。なお培養液中に於けるいは培養液中に消泡を必要とする時はシリコン樹脂、大豆油、アデカノール等の消泡剤を使用できる。

化合物(II)、(III)、(IV)の生産のための培養温度は20-30℃が好ましく、化合物(II)、(III)、(IV)は好氣的に培養して得られるが、ペニンシリン系の抗生物質の生産のために用いられる。而とう培養法、通気調節等々培養法がそのまま本発明のために用いられる。

化合物(II)、(III)、(IV)の生産の一例であるアスペルギルス・ニガー NRRL 3122 を、グルコース1g、糊粉5g、デンプン2g、ソイビーンミール2g、 K_2HPO_4 0.3g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05gを含む培養地に接種し37℃で6日間振とう培養した時培養液のpHは6.0程度になり、化合物(II)、(III)、(IV)の生産は最高に達する。また化合物(II)、(III)、(IV)の培養液中での生産量は、用途した、培養での培養条件によつて異なる事は専門致知によつて公知

10

の事実である。したがって菌株の改良、培養条件の選定によつて単一の化合物のみを生産せしめる事、特定の化合物を合理的に生産せしめる事は専門家にとつて容易な事である。この発明はそれ等のすべての修飾方法をも包括するものである。さらにアスペルギルス・ニガー 8 R 2 L 3122 を上述の如く培養したとき、培養物中に未知化合物オロボール並びにグネステイン（偶れもイソフラボンの一種）を生産していることが認められた！

本出願人の両日出願に係る特願第 499-

号明細書抄録：発明の名称「微生物によるオロボールの製造法」。化合物(I)，(II)，(III)の定量は D.D.C の吸光度を測定することによつて定数できる。D.D.C 活性阻害はアワバウ等の方法 (J. Biol. Chem.; 235, 124, 1960) に従つて測定されるが詳細は下記のとくである。

I - ドーパ 1×10^{-3} モル/L、ピリドキサルリン酸 7.5×10^{-3} モル/L、ドーパデカルボキシラーゼ（この条件下で OD 278 mμ = 0.3 を得る酵素量、通常、蛋白質 1 mg/ml）0.05 ml、リ

11

質に依つて、培養液中の懸体部分に存在している、これら化合物は pH 2.0 でブタノール、酢酸エチル、酢酸ブチル等に抽出される。一方、懸体中の化合物(I)，(II)，(III)は水と混じる有機溶剤、例えば、メタノール、エタノール、アセトン、等で抽出し、減圧蒸留によつて濃縮し、これを pH 8.0 のアルカリ水に溶解し、不溶成分をのぞいたのち、培養液と同様に溶解液を酸性 (pH 2.0) に調整後ブタノール、酢酸ブチル、酢酸エチル等に抽出し、培養液から化合物(I)，(II)，(III)を抽出した溶剤と混合して減圧濃縮する。

上記の減圧濃縮物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、クロロフォルム：メタノール 50 : 1 の混合溶剤で溶出すると D.D.C 活性を有する 6 ケの分画にわけられる。すなわち、フラクション 80 ~ 90 にフェーアクトリグニン〔化合物(II)〕、フラクション 95 ~ 98 にグネステイン、フラクション 55 ~ 75 に新規化合物(III)、フラクション 70 ~ 80 にオロボールが、最後のフラクション 300 ~ 320 に 8-ハイドロキシゲ

13

特開 14750-160483(4)

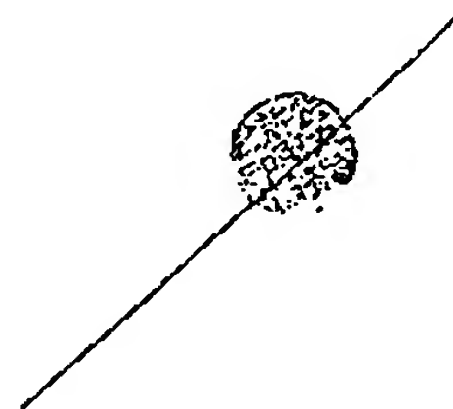
ン酸脱衛液 (pH 8.9) 0.03 モル/L、イソプロニアジド (ISOPROPIAZIDE) 1×10^{-3} モル/L を合わせ、水で全容 1.8 ml とする。この混合液を 37℃、25 分間反応させ、精製するドーパミンを陽イオン交換樹脂アンベライト 00-20 (ローランドハース社製) アンモニウムに吸着させ、水洗後、1 N 塩酸で溶出し、分外部 279 mμ の吸収を測定した。その値より生成ドーパミン量を定数し、収率率を求めた。

次に化合物(I)，(II)，(III)の抽出、精製について記述する。これ等の化合物はアルカリ水、メタノール、エタノールアセトン等に極めて良く溶解し、ブタノール、酢酸エチル、酢酸ブチル等にも溶解する。培養液中のこれら化合物は酸性でブタノール、酢酸ブチル等で抽出される。これら化合物は熱に安定であり、100℃3 分間の加熱により、活性は低下しない。又 60℃30 分間の加熱で、pH 8.0、7.0、2.0 で安定である。また化合物(I)，(II)，(III)は pH 2.0 で酢酸ブチルに溶解することから、これら化合物は弱酸性物質である。この性

12

ニステイン〔化合物(III)〕が溶出分離される。これらのイソフラボン誘導体のそれぞれを減圧濃縮し、メタノールに溶解し、セファクセル M-30 等により精製する。更にその活性部をシリカゲル (00-7-200 ~ 328 メッシュ - マリンクロット) 等のクロマトグラフィーを利用して、精製できる。化合物(I)，(II)，(III)は高純度を精製、例えばベンゼンから結晶化される。

次に本発明によつて明らかにされた化合物(I)，(II)，(III)の理化学的性状、及び生物学的性状について記載する。



26

A) 化合物(I), (II), (III)の理化学的性質

本発明によつて得られる化合物(I)は、淡褐色の、針状結晶であり、 262°C で溶解分解する。元素分析の結果の一例はC: 60.63%, H: 3.86%, O: 35.51%で計算及び他の元素は含まれない。マスマスペクトルグラフィーで $m/e=316$ が与えられ、 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$ の分子式を有する。なお、 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$ の分子式を有する化合物の元素分析の理論値は、C: 60.76%, H: 3.84%, O: 35.41%である。又、化合物(II)はアルカリ水、メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、ジメチルスルホキシド等によく溶解するが、ベンゼン、クロロホルム、トルエン等には溶けにくい。

紫外線吸収スペクトル曲線では、メタノール溶液中で $268\text{m}\mu$ ($\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}=960$)、 $296\text{m}\mu$ ($\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}=360$)に吸収極大を有する。又、0.01規定塩酸を含む酸性メタノール溶液では、 $268\text{m}\mu$ ($\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}=960$)、 $295\text{m}\mu$ ($\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}=360$)に吸収極大を、0.01規定水酸化ナトリウムを含む

18

塩性のプロトンがあり、カップリングをしている。更に、 8.36ppm に芳香族性のプロトンが1個存在する。 3.86ppm にメトキシ基1個が存在する。又、オーバーハウザー効果の測定により、メトキシ基は8位に結合していることが示唆された。

ジメチル硫酸でメチル化を行なうと、4個のメチル基が導入され、テトラメチル体を得られる。このメチル体のメトキシ基に就いて、オーバーハウザー効果を測定することにより、置換基の位置が3', 4', 5, 7, 8位であることが決定された。又、無水酢酸でアセチル化すると、アセチル基が4個導入され、テトラアセチル体を得ることができた。これにより、フェノール基の水酸基が4個存在することが決定された。更にこのアセチル体を惹クロホルムに溶かし200メガヘルツの移動磁気共鳴スペクトルを検討することにより、このアセチル体のB環のプロトンのカップリングの様式が明らかになった。これによりB環の置換様式は1, 2, 4置換様式であることが決定された。

19

むアルカリ性メタノール溶液中では $279\text{m}\mu$

($\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}=960$)、 $345\text{m}\mu$ ($\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}=420$)に吸収極大を示す。

臭化カリウムとして紫外線吸収スペクトルを測定すると、波数 $340, 1660, 1530, 1450, 1580, 1270, 1240, 1180, 1115, 1065, 1035, 995, 910, 865, 830, 780, 750, 680\text{cm}^{-1}$ に吸収が見られる。

定性反応は、縮化第二鉄反応、2,6-ジクロロキノロンクロロイミド反応、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン反応は陽性、エールリッヒ反応、ニヒドリッヒ反応は陰性である。シリカゲルの薄層クロマトグラフィーでは、クロロホルム:メタノール $10:1$ で R_f 値 0.38 、酢酸エチル:メタノール $20:2$ で R_f 値 0.70 である。

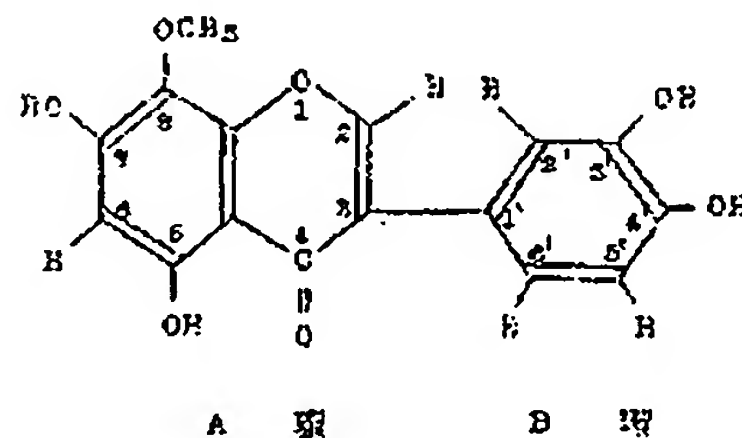
この化合物(I)の100メガヘルツの移動磁気共鳴スペクトルに於いて、重アセトン中で 8.30 付近に水素結合した水酸基の2個のプロトン、 8.20 にイソフラボン骨格のプロトンが1個、 7.1A 、 6.92ppm にそれぞれ1個と2個の芳香

16

すなわち、B環の置換基の位置は、1', 3', 4'位であることが決定された。

紫外線吸収の極大が臭化アルミニウムの添加により $24\text{m}\mu$ 長波長にシフトすることにより、5位に水酸基が、無水ソーダ添加により $21\text{m}\mu$ 長波長にシフトすることにより、7位にそれぞれ水酸基が存在することが決定された。

以上の結果により、化合物(I)は次の構造式を有するところの、3', 4', 5, 7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボンであると決定した。



化合物(I), (II)の構造は化合物(I)の構造を決定し

16

特許 明50-160483(B)

18

張

B) 化合物(I), (II), (III)の生物学的性状

a) 化合物(I), (II), (III)の毒性は85%ジメチルホルムサイト水溶液に溶解して、マウスの腹腔内に投与したときいずれの化合物も250mg/kgで毒性を示さなかつた。

b) 化合物(I), (II), (III)の各種酵素活性に対する阻害活性、(I), (II), (III)の阻害活性は前述の方法で測定した時の化合物(I), (II), (III)の50%阻害濃度はそれぞれ表2に示したとおりであつた。

表 2

化合物名	D.D.C 50%阻害濃度
I	0.2 μ g/ml (8.0×10^{-7} M)
II	01.0 μ g/ml (1.7×10^{-6} M)
III	2.8 μ g/ml (9.2×10^{-6} M)

四) H D C の阻害活性は下記に示す方法にしたがつて測定した。すなわちI - ヒステジン - 2 - 14 C (1.0×10^5 cpm) を 5.0×10^{-6} M、ピリドキサルリン酸 5.0×10^{-6} M、ヒステジンデカル

21

et al ; The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 174 83-88, 1970) このように測定した時の化合物(I), (II), (III)のCOMTの50%阻害濃度は表4に示したとおりであつた。

表 4

化合物名	COMT 50%阻害濃度
I	6.5 μ g/ml (2.0×10^{-6} M)
II	8.8 μ g/ml (1.9×10^{-6} M)
III	1.0 μ g/ml (3.5×10^{-6} M)

五) エストラジオールに特異的に結合する子宮頸癌に対する結合阻害剤の測定法は、スタンレーの方法 (O.K. Stanley ; Journal Clinical Endocrinol and Metabolism 28, 127, 1968) に準じて測定した。エストラジオールが結合するのを50%阻害する化合物(I), (II), (III)の濃度は表5に示したとおりであつた。

23

特開 昭50-160483 (7)

メキシラーゼ (50% 1 mg/ml 0.1 ml, リン酸緩衝液 (PH 6.8) 0.067 M の混合液に 0.1 ml の検定する試料を入れ、脱イオン水で全容を 1.0 ml とし、37℃で2時間反応させ、生成したヒスタミン - 2 - 14 C をアンバーライト CO-80 アンモニア型に吸着させ、水洗後、1 M アンモニア水で、生成ヒスタミンを洗脱させ、プレートのシンチレーションカウンタで測定し、生成ヒスタミン量を求める。このように測定したときの化合物(I), (II), (III)のH D C の50%阻害活性は表3に示した。

表 3

化合物名	H D C 50%阻害濃度
I	3.5 μ g/ml (1.1×10^{-6} M)
II	39.0 μ g/ml (1.3×10^{-6} M)
III	0.7 μ g/ml (2.3×10^{-6} M)

六) COMTの阻害活性はニコデジエビツク等が報告した方法に準じて測定した。(D. Sirodegaric

22

表 5

化合物名	50%阻害濃度
I	2.1 μ g/ml (6.0×10^{-6} M)
II	2.7 μ g/ml (9.0×10^{-6} M)
III	>20.0 μ g/ml (> 7.0×10^{-6} M)

本発明により新規化合物(I)および化合物(II), (III)が糸状菌等の微生物によつて作られることが明らかになつたので、この明細書に記載された知見に基づいて、本明細書に記載された方法を修飾した方法が容易に想到される。修飾阻害剤の生産は前述の菌種に限らない。他の糸状菌を用いてこれを生産するとは、専門家にとつて容易なことである。本発明はそのすべての修飾方法を含括し、以下に示す実施例はその例示であつて、本発明は実施例に限定されるものではない。

実施例 1

アスペルギルス・ニガー NRRL 3182 株 (農工研 寄附第 2063 号) をポテトデキストロース寒天斜面培地に14日間生育させ、そこから一白金

24

原料を馬鈴薯デンプン 8 ㍑、グルコース 1 ㍑、ソ
イビーンミール 2 ㍑、 KH_2PO_4 0.1 ㍑、 $\text{MgSO}_4 \cdot$
 $7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 ㍑を含む培地 1.5 ㍑を 500 cc 容
積の瓶とフラスコに分注し、28°C 20 分間
振荡したものに接種し、28°C で毎分 330 回転
の振とうで 5 日間培養した。DE は糖原 6.0、
1 日後 5.8、2 日後 5.8、3 日後 5.2、4 日後
5.0、5 日後 4.2 であった。

上記 5 日間培養後の培養液は 1 ㍑中 1 ㍑の濃
度の化合物印を、化合物印を 0.5 ㍑、グニステ
エイン 5 ㍑、D-ハイドロキゲンステエイン
0.05 ㍑を含むしていた。又培養液 10 ㍑より
得られる固体に 5 ㍑のメタノールを加えインフラ
ボン骨格を有する化合物を抽出した。このメタノ
ール溶液 1 ㍑中には化合物印は 2 ㍑、化合物印
は 0.5 ㍑、グニステエインは 5 ㍑、化合物印は
0.05 ㍑含まれていた。この培養液 10 ㍑を
過して清澄な溶液 9 ㍑と固体固形部 1.8 ㍑が得ら
れた。培養液は 2 リン酸で pH 2.0 とし、
4.5 ㍑の酢酸ブチルで 3 回抽出した。固体固形

25

部は 5.5 のメタノールを加えてよく攪拌抽出し、
A. B. 7.2 のメタノール抽出液が得られた。このメ
タノール抽出液を減圧蒸発乾燥した後、1 ㍑の水
を加え、2 N-NaOH で pH 8.0 とにしろ液し不溶
部を除く、D.D.C 阻害活性はそのほとんどが可溶
部に存在する。この可溶部分を 2 N-HCl で pH
2.0 とにし、50°C の酢酸ブチルで 3 回抽出
し、この抽出液と前記培養液より D.D.C
阻害物質を抽出した酢酸ブチルを合せて、減圧
蒸発乾燥して、黒褐色のタール物質 2.5 ㍑を得
た。このものの D.D.C に対する 50 ㍑阻害値 37
㍑/㍑であった。このタール物質をメタノール
100 ㍑に溶解し 80 ㍑のシリカゲル（マリンク
ロット社製シリシリック・アシッド C-9 スペシャ
ル）を加えて減圧蒸発乾燥し、これをクロロホル
ム：メタノール（50：1）の溶液系で上記シリ
カゲル 80 ㍑をゲル化させ 3.6 ㍑×4.5 ㍑のカラ
ムにつめ、その上端に乾燥物をのせ、上記の溶液
系でカラムクロマトグラフィーを行い 20 ㍑の分
面で蓄出すると D.D.C 阻害分留は 5 ㍑の分面に分

26

下で蓄出するとそれぞれの精製品が得られた。こ
れらの精製品をメタノールベンゼンから再結晶し
それぞれの精製品が得られた。これらの精製
で化合物印が 25.8 ㍑、化合物印が 4.8 ㍑、グニ
ステエインが 80.5 ㍑、オロボールが 0.1 ㍑、化
合物印が 4 ㍑のそれぞれの精製品が得られた。

実験例 2

ジャーによる培養は、実験例 1 のフラスコ培養
の場合と同様な培養を作製し、アスペルギルス・
ニガー NRRL 3122（農工研研第 2003 号）の
斜面培養から一白金耳量を増殖し、二日間培養し
たものを接種とする。馬鈴薯デンプン 2 ㍑、
 KH_2PO_4 0.1 ㍑、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 ㍑を含む培
地 1.5 ㍑を 300 cc 容のジャーに仕込み、28°C、
30 分間振荡し、これに先きの種菌を 2 ㍑添加し、
温度 27°C、毎分 200 回転で振とう、通気量毎分
10 ㍑で 8 日間培養した。この培養液 1.8 ㍑をバ
スケット型濾過機で濾過し、2.8 ㍑の溶液を得た。
実験例 1 と同様に酢酸ブチル 5 ㍑で 3 回抽出しこ
れを減圧蒸発し、1.5 ㍑のタール状物質を得た。

28

27

この抽出率は85%であつた。固体部分にはメタノール0.5を加え、D.D.O 阻害活性物質をメタノールに抽出せしめ、このメタノールを分離し、減圧蒸餾することにより、20gのター状物質を得た。この活性抽出率は70%であつた。母液及び固体から得たター状物質をシリカゲル(60-ウーンスペシャル-マリンクロット)500gを充填したクロマト管で分離、精製し、D.D.O 阻害活性を有する5つの分画を得る。実施例1と同様にそれぞれをセファデックスLB-20、100gのクロマトグラフィーで精製し、さらにシリカゲル(マリンクロット社製シリシリツクXR00-7 200~325メッシュ)500gを充填したクロマト管をもちいクロマトグラフィーを行ない精製し、メタノールベンゼンから結晶化させた。この場合は20.8gの化合物(I)、7.8gの化合物(II)、11.5gのゲニステイン、0.1gのオロボル、5.2gの化合物(III)の結晶を得た。

実施例 B

シクロによる培養は実施例1と同様にして培養

29

比路で同様に精製し以下の量のイソフラボン誘導体の結晶を得た。即ち化合物(II)を180g、化合物(III)を10.2g、ゲニステインを100g、オロボルを20.8g、および化合物(IV)を43.5g、各々の結晶として得た。

4. 図面の簡単な説明

第1図は化合物(I)の純メタノール溶液(曲線a)、0.01規定塩酸を含む90%メタノール溶液(曲線b)、及び0.01規定水酸化ナトリウムを含む90%メタノール溶液(曲線c)中の紫外線吸収スペクトル曲線を示す。

第2図は第1図と同様な溶剤中での化合物(II)の紫外線吸収スペクトル曲線を示す。

第3図は第1図と全く同様な溶剤中での化合物(III)の紫外線吸収スペクトル曲線を示す。

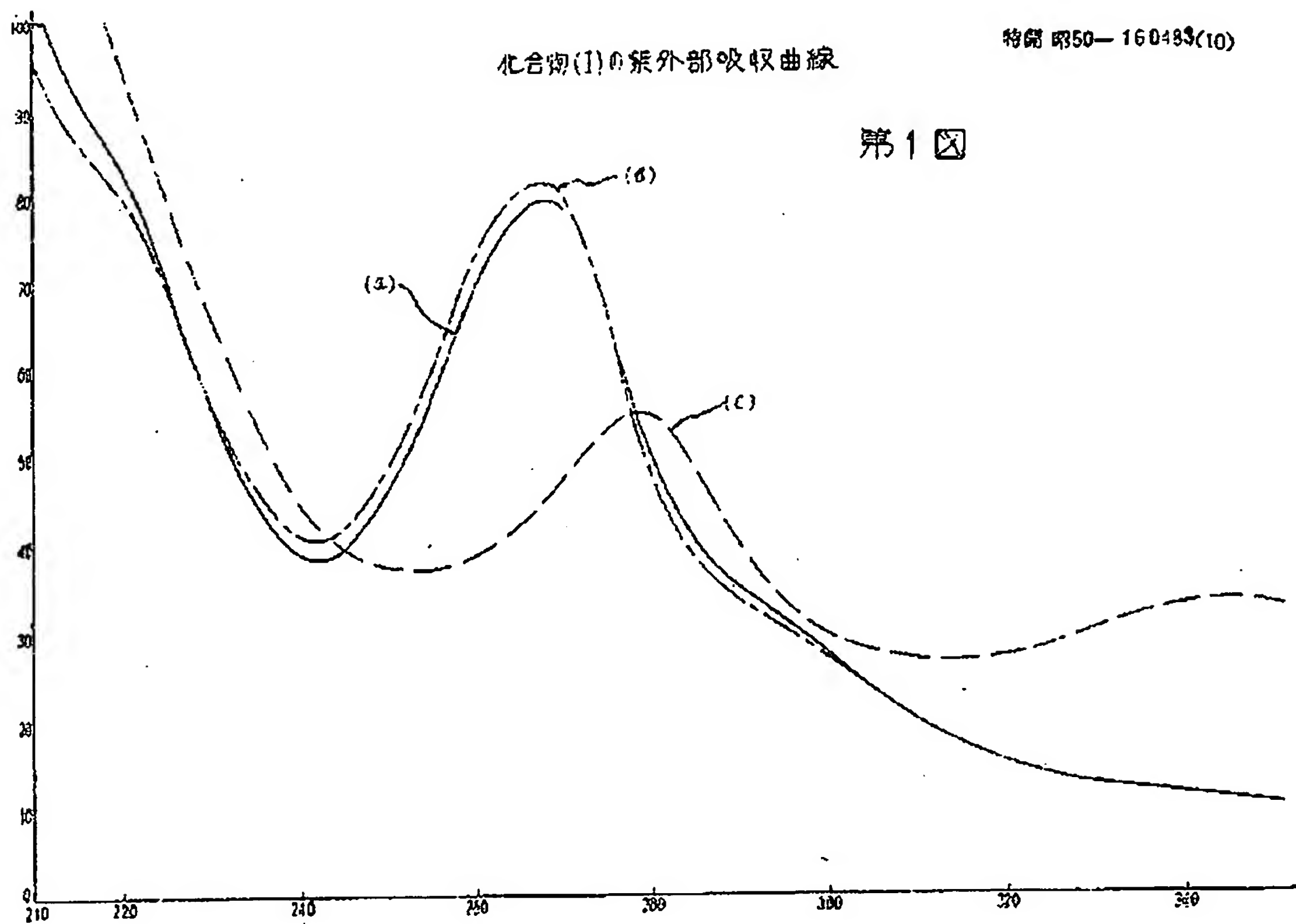
第4図、第5図、第6図はそれぞれを異化カリウム純剤中で測定した時の化合物(I)、II、IIIの紫外線吸収スペクトル曲線を示したものである。

した酵母を第1次酵母とし、実施例Aと同様にして培養した酵母を第2次酵母として、200g容のステンレススチール製タンクに実施例1と同様の培養を250g仕込み、シリコン樹脂を0.01%加え11.5℃、30分間減圧し、これに第2次酵母を0.2g加え毎分200回転で撹拌し、27℃で5日間培養した。この培養液をフィルタープレスでろ過し250gの培養液と固体21gを得た。培養液は実施例1及び2と同様に塩酸でpH 2.0となし酢酸ブチル0.02で3割地溶液中に含有されているD.D.O 阻害物質を抽出した。又固体部分に含まれるD.D.O 阻害物質の抽出は60gのメタノールを加え、かく拌、抽出、ろ過し、メタノール抽出液0.3gを得た。このメタノール溶液を減圧、蒸餾、乾固し、一酸化水酸化ナトリウムを加えつつ20gの水(pH 8.0)に溶解した。この溶液に過塩酸を加え、pH 2.0となし、酢酸エチル0.5gで3回抽出した。この酢酸ブチル抽出液は、培養液より抽出した酢酸ブチルとあわせ減圧蒸餾乾固し以後実施例1と同様の

30

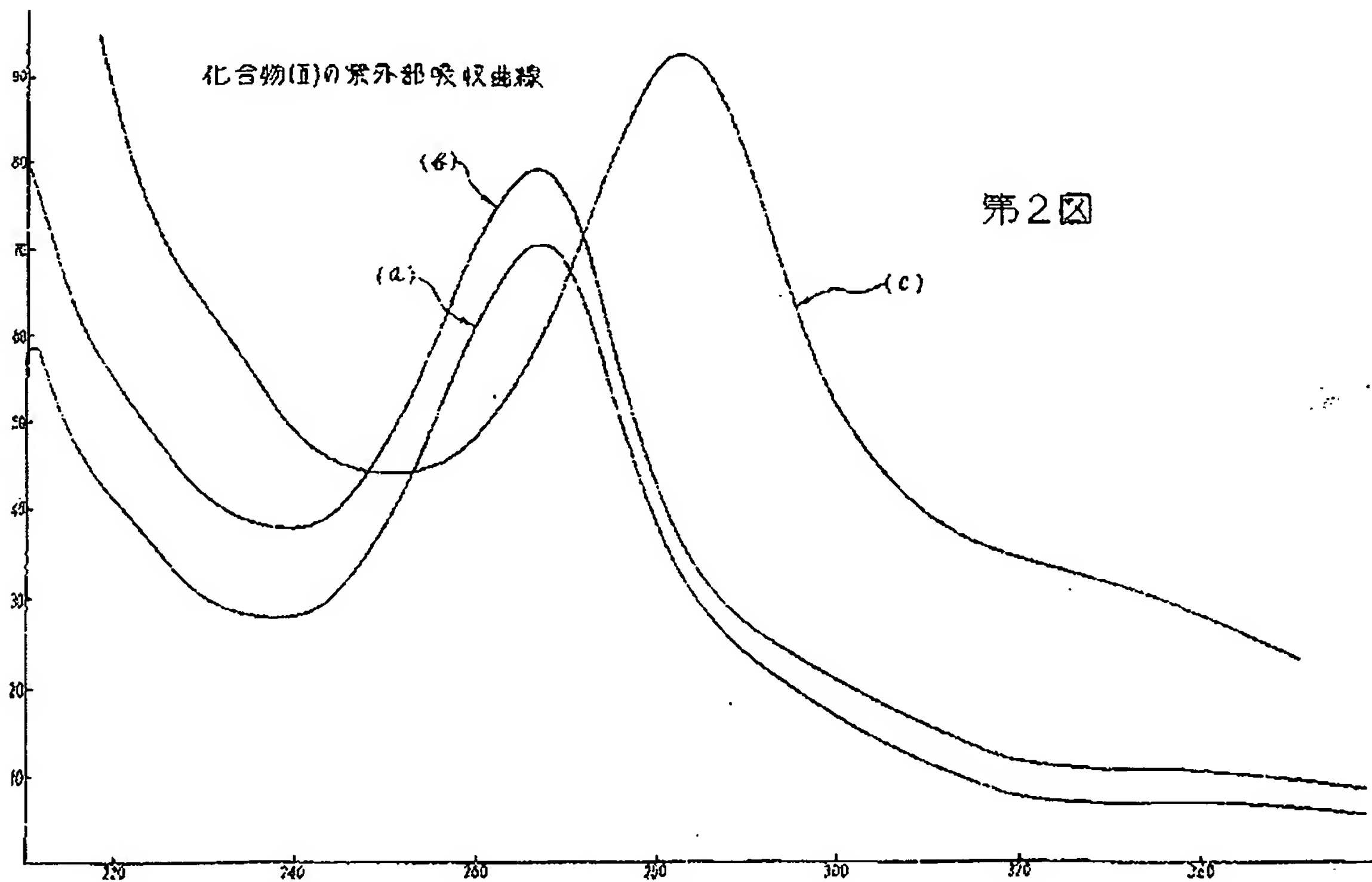
化合物(I)の紫外吸収曲線

第1図

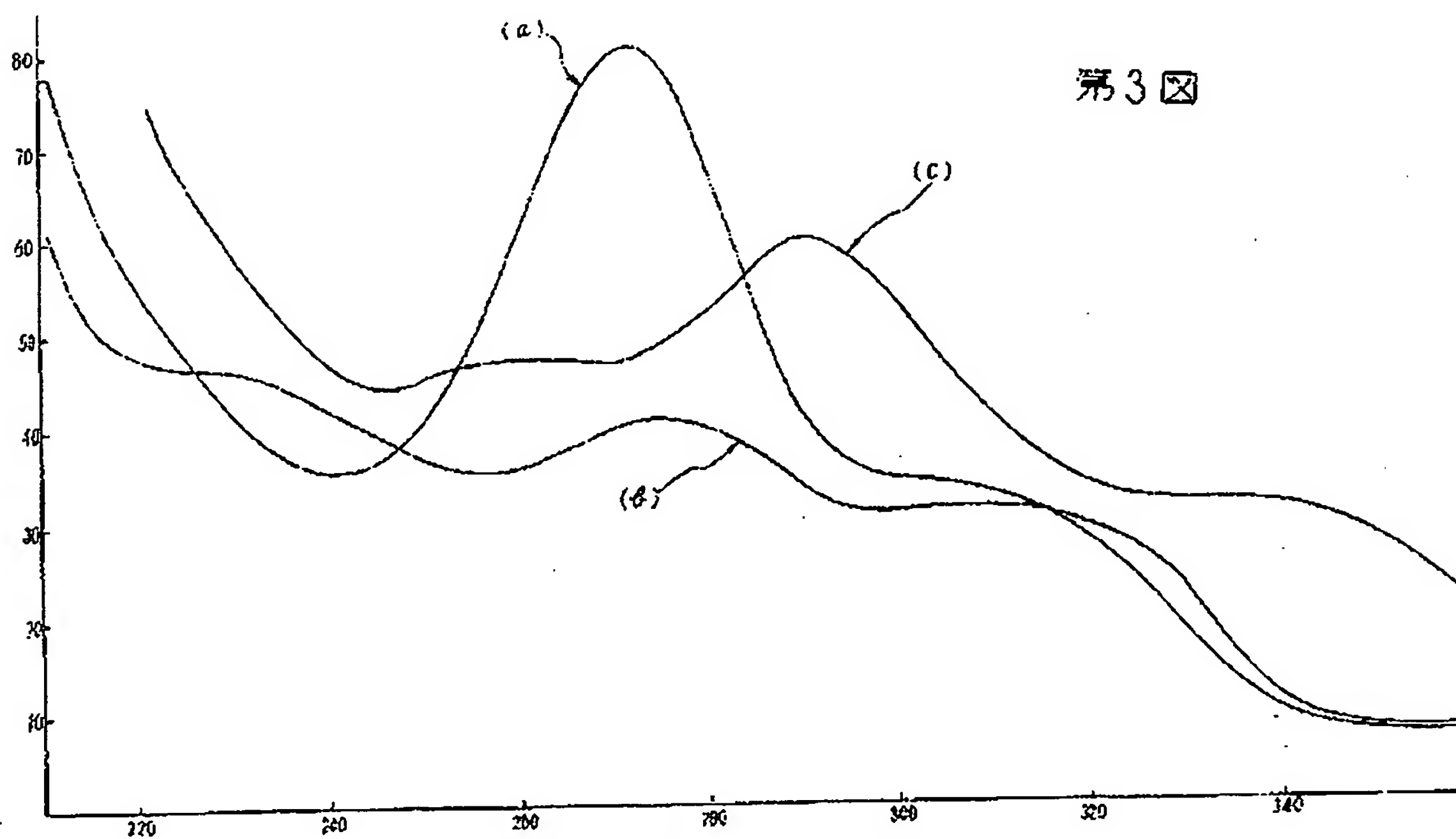


化合物(II)の紫外吸収曲線

第2図



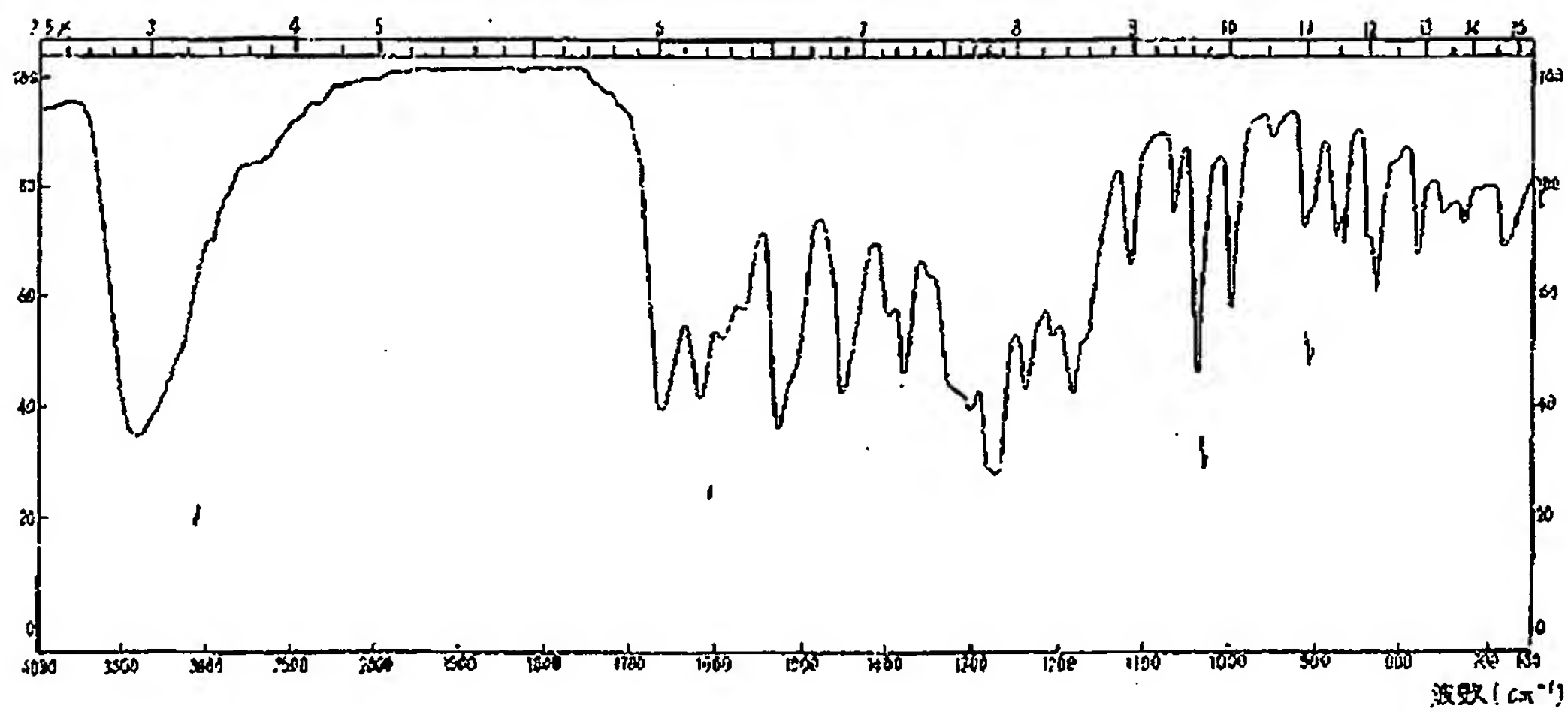
化合物(Ⅲ)の紫外吸収スペクトル曲線



第3図

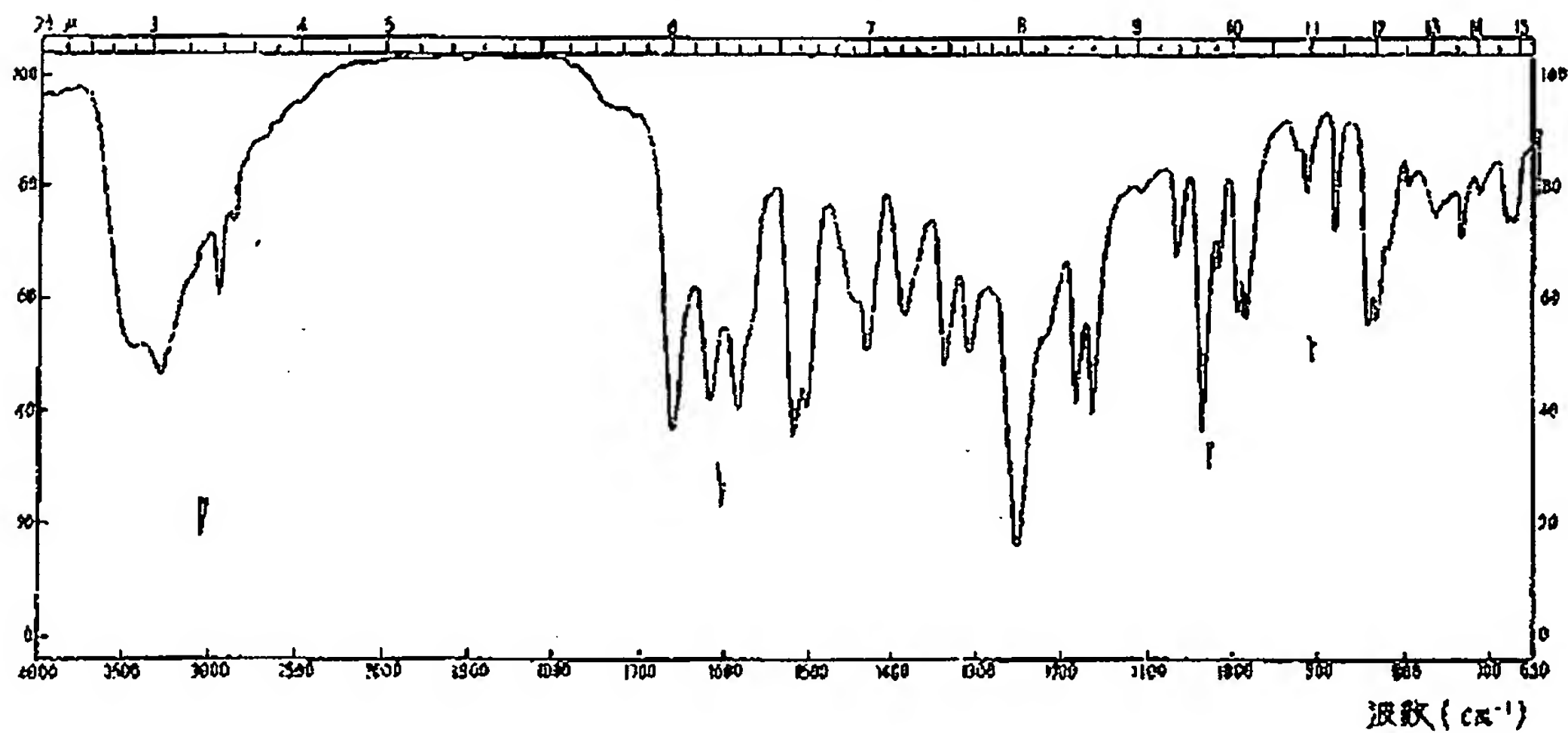
第4図

化合物(Ⅰ)の赤外吸収スペクトル曲線



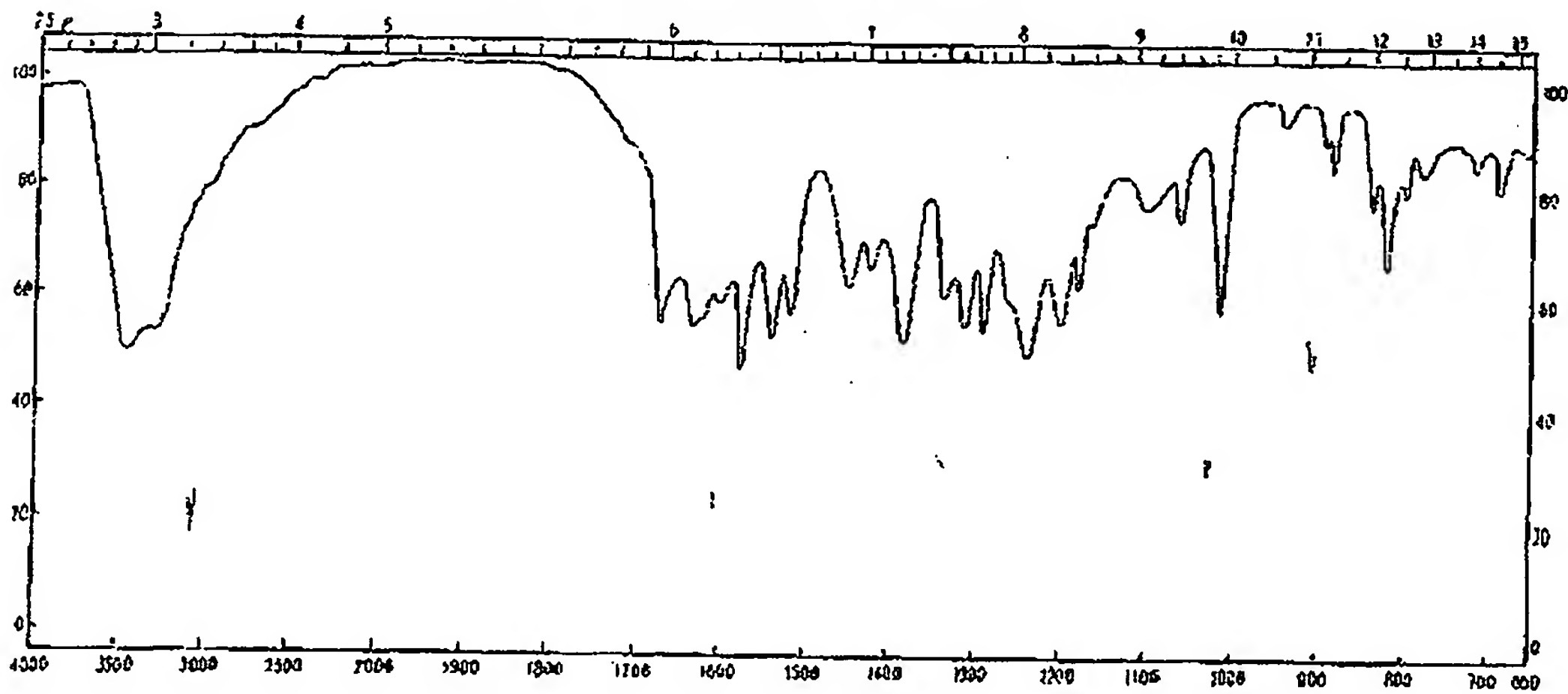
第5図

化合物(Ⅱ)の赤外吸収スペクトル曲線



第6図

化合物(Ⅲ)の赤外吸収スペクトル曲線



手続補正書 (自発)

昭和 49 年 10 月 3 日

特許庁長官 殿

6. 添附書類の目録

- (1) 明細書 1 通
 (2) 図面 1 通
 (3) 委任状 1 通
 (4) 願書副本 1 通
 (5) 微生物受託番号通知書 1 通

7. 前記以外の発明者、代理人

(1) 発明者

住所 東京都品川区東五反田5丁目1番11号
 ニューフジマンション701-A

氏名 竹内 貴雄

住所 東京都世田谷区東玉川町8丁目12番地

氏名 戸部 広 敏

(2) 代理人

住所 東京都港区西新橋1丁目2番9号
 三井物産館内

氏名 朝内 忠 夫

同所 八木田 茂

同所 浜野 孝 雄

同所 森田 悟 二

1. 事件の表示

昭和 49 年 特 許 願 第 69119 号

2. 発明の名称 生体活性を有するイソフラボン
化合物の微生物による製造法

3. 補正をする者

事件との関係

特許出願人

住所

東京都品川区上大崎3丁目1番23号

氏名

財団法人微生物化学研究会

4. 代理人

住所

東京都港区西新橋1丁目2番9号、三井物産館内

(2400)

氏名

金丸 義 男

5. 補正の対比

明細書の発明の詳細な説明の欄

A. 補正の内容

- (1) 明細書第3頁第6行の「パー・ボンソン」を「パーキンソン」と訂正する。
 (2) 同第6頁第4行の「Wilson」を「Wilson」と訂正する。
 (3) 同第7頁第4行の「パーキンソン」を「パーキンソン」と訂正する。
 (4) 同第10頁第9行の「。」を削除する。
 (5) 同第11頁第10行の「ター」の次に「67/11」を加える。
 (6) 同第11頁第4行(下から)の「リード・バ」の前に「経緯度で」を加え、「セル/と」を「M」と訂正する。
 (7) 同第11頁第3行(下から)の「セル/と」を「M」と訂正する。
 (8) 同第12頁第1行の「セル/と」を「M」。
 「イソブ」を「イブ」とそれぞれ訂正する。
 (9) 同第12頁第2～3行の「セル/と」を「M」。

台わせ、」を削除し「Mの炭水化合物に限定する試料の、」を加え」を加える。

(10) 同第12頁第3行の「アンバライト」を「アンバライト」と訂正する。

(11) 同第12頁第2行の「エタノール」の次に「。」を加える。

(12) 同第12頁第3行の「エチール」を「エチル」と訂正する。

(13) 同第12頁第4行の「ブテール」を「ブテル」、「エチー」を「エチ」とそれぞれ訂正する。

(14) 同第12頁第5行の「ロウター」を「マリンクロフト社製シリカ&PCC-7」と補正する。

(15) 同第12頁第3行～第6行の「マリンクロフト」を削除する。

(16) 同第12頁第6行の「マスペクトルグラフイー」を「マスペクトロメトリー」と補正する。

(17) 同第12頁第3行の「340」を「3400」と訂正する。

(18) 同第12頁第10行の「分子式」を「分子量及び分子式」、「300」を「200, C₁₀H₁₂O₆」。

「284」を「284, C₁₃H₁₀O₄」と修正する。

即 同第20頁第1の第8行、第9行、第10行の各「mo」をいずれも「nm」と訂正する。

即 同第23頁第2行の「exDerimental」を「exDerimental」と訂正する。

即 同第26頁第7行および第9行の「ブテール」を「ブケル」と訂正する。

即 同第26頁第7行の「シリシリツク。アレドCC-7」を「シリツク&RCC-7。」と補正する。

即 同第26頁第8行の「外質」を「物質」、「37」を「30」と訂正する。

即 同第27頁第3行（下から）の「シリシリツク」を「シリツク」と訂正する。

即 同第28頁第2行の「メタノール」の次に「・」を加入する。

即 同第28頁第9行（下から）の「28、」の次に「グルコースノ2、ソイビーンミール2%、」を加入する。

即 同第28頁第6行（下から）の「き」を削除する。

即 同第28頁第3行（下から）の「し、」の次に「固体洗練液を合せて」を加入する。

即 同第29頁第4行〜第7行の「CC-7&スベシヤル〜マリンクロツト」を「マリンクロツト&シリツク&RCC-7、スベシヤル」と補正する。

即 同第29頁第9行（下から）の「シリシリツク」を「シリツク」と訂正し、「-7」の次に「・」を加入する。

即 同第29頁第6行（下から）の「メタノール」の次に「・」を加入する。